

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(5)

(11)Publication number : 05-322817

(43)Date of publication of application : 07.12.1993

(51)Int.Cl.

G01N 27/02
G01N 33/50
// C12Q 1/68

(21)Application number : 04-310445

(71)Applicant : HOUSTON ADVANCED RES CENTER
BAYLOR COLLEGE MEDICINE
MASSACHUSETTS INST OF TECHNOL <MIT>

(22)Date of filing : 19.11.1992

(72)Inventor : EGGERS MITCHELL D
HOGAN MICHAEL E
BEATTIE KENNETH L
SHUMAKER JOHN
EHRlich DANIEL J
HOLLIS MARK

(30)Priority

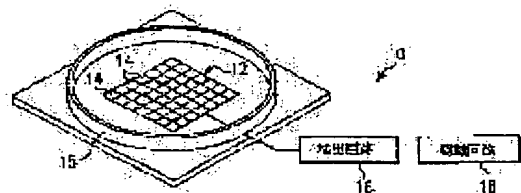
Priority number : 91 794036 Priority date : 19.11.1991 Priority country : US

(54) MOLECULE DETECTING METHOD AND APPARATUS THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To safely, simply and accurately fix the molecular structure in a sample by adding a sample to a test site forming the probe bonded to a known molecular structure and subsequently applying an electric signal to detect the electrical properties thereof.

CONSTITUTION: The respective test sites 14 formed in a semiconductor wafer contain a large number of probes capable of being bonded to a known molecular structure (hereinbelow referred to as a target substance) and is surrounded by a ring 15. When a sample containing the target substance is injected into the ring 15, the target substance is bonded to the related probe within the specific site and, after a time sufficient to bond is elapsed, the surface of the sample is washed to remove the excessive target substance. Next, a detection circuit 16 sends an electronic signal to respective sites 14. The site 14 having the bonded target substance is changed in electrical properties and the circuit 16 detects this change. Therefore, the bonding of the specific target substance and the probe is detected in the respective sites 14 within the array 12 and the compsn. of the target substance present in the sample can be determined.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.11.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3310705

[Date of registration] 24.05.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-322817

(43)公開日 平成5年(1993)12月7日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/02	D	7363-2 J		
33/50	P	7055-2 J		
// C 1 2 Q 1/68	ZNA A	8114-4B		

審査請求 未請求 請求項の数38(全 13 頁)

(21)出願番号 特願平4-310445

(22)出願日 平成4年(1992)11月19日

(31)優先権主張番号 794036

(32)優先日 1991年11月19日

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 591069628

ヒューストン・アドバンスド・リサーチ・センター

HOUSTON ADVANCED RESEARCH CENTER

アメリカ合衆国テキサス州77381, ザ・ウッドランズ, リサーチ・フォーレスト・ドライブ 4802

(74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

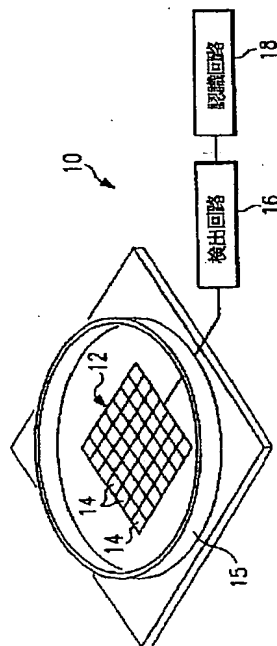
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 分子を検出する方法および装置

(57)【要約】

【目的】本発明は、試料物質中の分子構造を同定するための方法と装置を提供することを目的とする。

【構成】本発明の装置は、多数のテストサイトを含むアレイを有し、それぞれのテストサイトの中には、関連する標的物質の分子構造と結合しうるブローブが連結されている。このテストサイトに試料物質を加えてブローブと結合させた後、テストサイトに電気的信号を送り、テストサイトの電気的性質を検出して、どのブローブが関連する標的物質分子構造と結合したかを決定する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】試料中の分子構造を同定する方法であって、多数のテストサイトであって、それぞれのテストサイトの中に関連する標的分子構造と結合するためのブローブが形成されているテストサイトに試料を加える；電気信号を該テストサイトに与える；および多くの異なる標的物質が検出できるように、テストサイトの電気的性質を検出して、どのブローブが関連する標的分子構造に結合したかを決定する；の各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】前記加える工程が、それぞれのテストサイトの中にオリゴヌクレオチドブローブが形成されている多数のテストサイトに試料を加える工程からなることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】前記加える工程が、それぞれのテストサイトの中に抗体ブローブが形成されている多数のテストサイトに試料を加える工程からなることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項4】前記加える工程が、それぞれのテストサイトの中に抗-抗体ブローブが形成されている多数のテストサイトに試料を加える工程からなることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項5】前記加える工程が、それぞれのテストサイトの中にペプチドブローブが形成されている多数のテストサイトに試料を加える工程からなることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項6】前記検出する工程が、テストサイトの誘電特性を検出する工程からなることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項7】前記電気信号を与える工程が、所定の周波数の範囲の信号を与える工程からなることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項8】前記検出する工程が、前記範囲における周波数緩和を検出する工程からなることを特徴とする、請求項7記載の方法。

【請求項9】前記検出する工程が、さらに、前記検出された緩和周波数を、結合していないブローブを有するテストサイトの既知の周波数と比較する工程を含むことを特徴とする、請求項8記載の方法。

【請求項10】前記電気信号を与える工程が、所定の別々の周波数における信号を与える工程からなることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項11】前記検出する工程が、前記所定の周波数におけるテストサイトの分散を比較する工程を含むことを特徴とする、請求項10記載の方法。

【請求項12】さらに、結合したブローブを有するテストサイトに基づいて構造を決定する工程を含むことを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項13】試料中の分子構造を同定するための装置であって、多数のテストサイトであって、それぞれのテ

ストサイトの中に関連する標的分子構造と結合するために働くことのできるブローブが形成されているテストサイト；電気的信号をテストサイトに与えるための回路；テストサイトの電気的性質を検出し、どのブローブが関連するターゲット分子構造と結合したかを決定するための回路；を有することを特徴とする装置。

【請求項14】前記ブローブの1つまたはそれ以上が、DNA分子と結合するために働くことができることを特徴とする、請求項13記載の装置。

10 【請求項15】前記ブローブの1つまたはそれ以上が、RNA分子と結合するために働くことができることを特徴とする、請求項13記載の装置。

【請求項16】前記1つまたはそれ以上のブローブが、オリゴヌクレオチドブローブからなることを特徴とする、請求項14記載の装置。

【請求項17】前記ブローブの1つまたはそれ以上が、細胞と結合するために働くことができることを特徴とする、請求項13記載の装置。

20 【請求項18】前記1つまたはそれ以上のブローブが、抗体ブローブからなることを特徴とする、請求項17記載の装置。

【請求項19】前記ブローブの1つまたはそれ以上が、抗体と結合するために働くことができることを特徴とする、請求項13記載の装置。

【請求項20】前記1つまたはそれ以上のブローブが、抗-抗体ブローブからなることを特徴とする、請求項19記載の装置。

30 【請求項21】前記1つまたはそれ以上のブローブが、ペプチドブローブからなることを特徴とする、請求項20記載の装置。

【請求項22】前記テストサイトがその中に形成された多数のウェルを有する材料層；それぞれのウェルの中に形成された、所望の分子構造と結合するブローブ；および前記ウェルに隣接して形成されたコンデンサー；を含むことを特徴とする、請求項13記載の装置。

【請求項23】前記コンデンサーが、それぞれのウェルの中に形成され、それぞれのウェルに共通の接地板と容量結合したプレートからなることを特徴とする、請求項22記載の装置。

40 【請求項24】前記コンデンサーがそれぞれ、ウェルの側壁に形成された第1および第2のプレートからなることを特徴とする、請求項23記載の装置。

【請求項25】前記検出回路が、テストサイトの誘電特性を検出するための回路を含むことを特徴とする、請求項13記載の装置。

【請求項26】前記電気信号を与えるための回路が、所定の周波数の範囲の信号を与えるための回路を含むことを特徴とする、請求項13記載の装置。

50 【請求項27】前記検出回路が、前記範囲中の緩和周波数を検出するための回路を含むことを特徴とする、請求

項26記載の装置。

【請求項28】前記検出回路がさらに、前記検出された緩和周波数と、結合していないプローブを有するテストサイトの既知の周波数とを比較するための回路を含むことを特徴とする、請求項27記載の装置。

【請求項29】前記電気信号を与える回路が、所定の別々の周波数における信号を与えるための回路を含むことを特徴とする、請求項13記載の装置。

【請求項30】前記検出回路が、前記所定の別々の周波数において前記テストサイトの分散を比較するための回路を含むことを特徴とする、請求項29記載の装置。

【請求項31】さらに、結合したプローブを有するテストサイトに基づいて構造を決定するための回路を含むことを特徴とする、請求項13記載の装置。

【請求項32】前記テストサイトが半導体表面に形成されることを特徴とする、請求項13記載の装置。

【請求項33】試料中の分子構造を同定するための集積回路であって、多数のテストサイト；前記テストサイトのそれぞれに形成されたプローブであって、それぞれの所定の分子構造と結合するために種々の構造を有するプローブ；テストサイトの電気的性質を検出し、テストサイトに関連するプローブがそれぞれの所定の分子構造と結合したか否かを決定するための回路；を含むことを特徴とする集積回路。

【請求項34】さらに、前記検出回路からの情報を処理するための処理回路を含むことを特徴とする、請求項33記載の集積回路。

【請求項35】前記テストサイトがそれぞれ、ウェルとともに形成された第1及び第2のコンデンサープレートを含み、前記プローブが前記コンデンサー表面の間におかれていることを特徴とする、請求項33記載の集積回路。

【請求項36】前記第1および第2のプレートが実質的に平行であることを特徴とする、請求項35記載の集積回路。

【請求項37】前記検出回路が、ある範囲の周波数の信号をそれぞれの前記テストサイトの前記プレートに発生させ、これに回答した分散を測定するために働くことができることを特徴とする、請求項35記載の集積回路。

【請求項38】前記検出回路が、別々の周波数の信号をそれぞれの前記テストサイトの前記プレートに発生させ、これに回答した分散を測定するために働くことができることを特徴とする、請求項35記載の集積回路。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、一般には分子の検出に関し、特にアレイ中の特定の空間的位置で結合した分子の存在を検出する方法および装置に関する。

【0002】

【従来の技術】多くの応用において、試料中の1つまた

はそれ以上の分子構造の存在の検出が望まれている。例えば、DNAまたはRNA配列決定は遺伝学的診断および疾病の診断、毒性試験、遺伝子工学研究、農業および医薬品の開発において極めて有用である。同様に、細胞および抗体の検出は疾病の診断において重要である。

【0003】分子構造を検出するために、多くの手法が開発されてきた。DNAおよびRNA配列決定においては、2つの方法、すなわち、オートラジオグラフィーおよび光学的検出が一般に用いられている。オートラジオグラフィーは³²Pまたは³⁵Sを用いて行われる。DNA配列決定のためには、核酸の断片を³²Pで末端標識する。この末端標識断片を大きさによって分離し、X線フィルムを特定の時間感光させる。フィルムの感光時間は、フィルムに接触する部分の放射能に直接関係する。

【0004】いかなる放射性標識もいくつかの欠点を伴う。第1に、放射性元素に長い間暴露されると、癌等の遺伝子的疾病にかかる危険性が増加する。そのため、放射性マーカーまたは標識を用いる場合には、放射線暴露を少なくするために予防措置を講じなくてはならない。典型的には、従業者は継続的に放射線暴露をモニターする器具を身につけなくてはならない。さらに、妊娠している女性は胎児に遺伝的な変異が生じることを防ぐために、よりいっそうの予防措置を講じなくてはならない。

【0005】さらに、核酸配列中に放射性標識を取り込ませることは、塩基配列決定の工程全体の複雑さとコストを増加させる。化学は平凡なものであるが、それでも追加の工程を必要とする。フィルムの感光もまた必要な労力と材料のコストを増加させる。コストは末端標識に必要な余分の試薬によって増加するだけではなく、放射性材料の安全な取り扱いに必要な予防措置の工程によっても増加する。

【0006】放射能の検出方法は、時間的にも空間的にも感度の限界がある。放射性標識の使用は一般に1mmの空間解像度を有している。空間的解像度を1mm以下に下げるには、追加のハードウェアおよびソフトウェアが必要である。オートラジオグラフィーのフィルムの検出感度は、放射性標識された断片がフィルムを感光させる時間と直接関係する。したがって、フィルムの感光時間はそれぞれの検出場所に存在する放射能のレベルによって、数時間から数日である。βスキャナーは、オートラジオグラフィーにおいてフィルム感光に必要とされる時間を著しく減少させることができる。しかしβスキャナーの使用はこのタイプの検出に伴う出費を著しく増加させ、実際には空間解像度は低い。

【0007】蛍光標識したリセプターの光学的検出もまた分子結合の検出のために用いられてきた。簡単にいえば、DNA配列決定においては、塩基特異的な蛍光色素をオリゴヌクレオチドプライマーまたは鎖の伸長を停止させるジデオキシヌクレオチドに結合させる。それぞれの色素の適当な吸収波長を選択し、これを用いて色素を

励起させる。色素の吸収スペクトルが互いに近い場合には、特定の波長を選択して色素のセット全体を励起させることができる。

【0008】色素を使用する光学的検出手法はいくつかあり、例えば、臭化エチジウムは2本鎖核酸を染色する。これらの色素の発する蛍光は、2本鎖のDNAまたはRNAと結合したときに、結合していない色素または1本鎖DNAに結合している色素の発する蛍光と比べ、約20倍の増加を示す。このタイプの色素は、ハイブリダイゼーション実験において、ハイブリダイズしたDNA（またはRNA）の存在を検出するために用いられる。光学的検出方法は塩基配列決定実験におけるスループットを増加させるが、その欠点は重大である。

【0009】蛍光標識された分子に用いられる種々の色素は、変異原性を有し、したがって発癌性を有することが示されている。例えば、臭化エチジウムはヒトDNAの中に入り込むことで、複製の間にDNAの特定の領域が正しく複製されないことがある。適当な予防措置、例えば手袋や注意深い実験手法によって、従業者の体内に色素が入り込むことを防ぐことができる。しかし、これらの変異原性のある試薬に対する暴露を低減することは利点を有している。さらに、妊娠した女性は胎児に遺伝的変異が生じることを防ぐために、より多くの予防措置を講じなくてはならない。

【0010】核酸配列中への蛍光標識の取り込みは、工程全体の複雑さとコストを増大させる。化学は平凡なものであるが、追加の工程を必要とする。コストは、蛍光標識のための追加の試薬によって増加するのみでなく、変異原性のある材料を安全に取り扱うために必要な予防措置の工程によっても増加する。

【0011】さらに、複数の蛍光色素の使用は標識された分子の電気泳動の移動度に影響する。科学者は、蛍光色素がこれと結合した核酸断片の電気泳動の移動度に影響を及ぼすため、塩基配列のデータには移動度の修正因子が必要であることを見出ししている。光学的検出法の使用は、ほとんど常に1本もしくはそれ以上のレーザー光線の使用を必要とする。選択される波長によっては、レーザーの安全な運転を確実にするために余分の予防措置を講じなくてはならない。必要とされる出力により、この投資は数百ドルから数千ドルにも及ぶ。

【0012】蛍光に基づくシステムを運転するためには、レーザーの他に追加のハードウェアを購入しなくてはならない。例えば、蛍光検出器および蛍光データを検出器に移送する光学的装置がこのシステムに必要な要素である。複数の励起放射波長を選択する場合には、特定の色素に関して適切な波長を選択する制御システムが含まれていなくてはならない。さらに、蛍光色素はベンダーから購入しなくてはならない。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】したがって、分子構造

検出のための、複雑でない、安全な、コストの低い、速い、正確な方法および装置が業界が必要とされている。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明は、同時に複数の分子構造を検出でき、従来の装置の有する欠点および問題点を実質的に排除あるいは予防しうる方法と装置を提供するものである。

【0015】本発明においては、試料物質を多数のテストサイトに加えるが、それぞれのテストサイトの中には既知の分子構造に結合しうるプローブが形成されている。電気信号を全体のテストサイトに与え、テストサイトの電気的性質を検出して、プローブが関連する分子構造に結合したか否かを決定する。

【0016】本発明は従来技術と比較して著しい利点を提供する。第1に、放射性元素、変異原性の蛍光色素あるいはその他の危険な材料への暴露が排除される。第2に、本発明を用いると、試料物質を単にテストサイトに加え、最少の試料と最少の試薬を用いて結合させるため、時間と材料を非常に低減させることができる。従業者は本発明の使用を指導するためのトレーニング時間は最少限である。さらに、微細加工されたテストサイトの大きさまで感度限界を下げることができ、感度限界は約1mm²と見積もられる。本発明は結合した1本鎖DNA断片と非結合1本鎖DNA断片の間のの弁別において10倍の差を示しており、これに対し、挿入色素による光学的方法によれば3倍の差しかない。

【0017】以下に図面にしたがって、本発明を詳細に説明する。

【0018】本発明の好ましい具体例およびその利点は、図1～7、これらの図に共通して用いられている数字および種々の図面の対応する部分を参照することにより、最もよく理解することができるであろう。

【0019】図1は、RNAおよびDNAの塩基配列決定に関して用いられる、本発明の好ましい態様を示す。下記に述べるように、本発明はまた、細胞の検出や抗体の検出にも用いることができる。

【0020】塩基配列決定装置10は、リング15によって囲まれたテストサイト14のアレイ12、検出回路16および認識回路18からなる。好ましい態様においては、アレイ12、検出回路16および認識回路18は、1つの集積回路として実施される。

【0021】操作においては、テストサイト14（以下に詳細に説明する）は、標準的な写真平板手法を用いて半導体ウエファーの中に形成される。それぞれのテストサイトは、既知の分子構造（以下標的物質と称する）に結合することのできる多数のプローブを含む。標的物質は、例えば、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、細胞、または抗体等の生体高分子でありうる。RNAおよびDNA塩基配列決定装置の場合には、合成プローブはオリゴヌクレオチド等からなる。テストサイト14にお

いて異なるプローブを用いることにより、1つのアレイ12中において多数の異なる標的物質を同時に検出することができる。

【0022】電解質溶液中の標的物質を含む試料物質をリング15の中に注ぐと、標的物質はテストサイト14の中で関連するプローブと結合する。結合のために十分な時間の経過後、表面を洗い流して過剰の標的物質その他の結合していない分子構造を除去する。残った標的物質構造のほとんどは、特定のテストサイト14において、微細加工されたアレイ12に連結されたプローブに結合する。次に、検出回路16によってそれぞれのテストサイト14に電子的な信号を送り、標的物質がそのテストサイトに結合したか否かを決定する。検出回路16はオンチップ（on-chip）でもオフチップ（off-chip）でもよい。検出回路16からそれぞれのテストサイト14にアドレスを送る。結合した標的物質を有するテストサイトは電気的性質が変化しており、これを検出することができる。したがって、電子的アドレスによって、微細加工されたアレイ12中のそれぞれのテストサイト14において、特定の標的物質／プローブ結合を検出し、試料物質中に存在する標的物質の組成を決定することができる。

【0023】認識回路18はDNA塩基配列決定に特異的なものである。認識回路18は、検出回路16において検出された標的物質（核酸）の組成に基づいた配列決定分析（後述する）を行う。その他の応用においては、標的物質検出に関する情報処理を行うためのその他の回路を用いることができる。

【0024】（テストサイト）テストサイト14の実例を図2aおよびbに示す。多数のこのようなテストサイトを1つの基板上に形成し、多数の標的物質を同時に検出することができる。図2aにおいては、二酸化シリコン等の絶縁材からなる絶縁層22の中にウェル20が形成されている。このウェルの底部に、コンデンサープレートとして機能する第1のプレート24aが形成される。この状態においては、リング15は導電性の材料から形成され、コンデンサーの第2のプレート24aとして働く。プローブ26は電極プレート24aの上に形成される。

【0025】図2bは同様の構造を図示する。ここでも、絶縁層22の中にウェル20が形成される。第1および第2のプレート24aおよび24bがウェルの2つの側面に形成され、局部電極対として働く。プローブ26はウェルの底部に連結される。

【0026】使用においては、試料物質中の標的物質はそれぞれのテストサイト14中のプローブ26に結合す

る。標的物質28がプローブ26に結合すると（図3を参照のこと）、ウェル20の誘電特性が変化する。図2aの構造においては、プレート24aとリング15（第2プレート24b）の間がコンデンサーとなる。同様に、図2bのテストサイト14においては、プレート24aと24bの間が平行板コンデンサーとなる。被験材料は2つのプレート間の誘電体として働く。

【0027】図2aおよびbの、テストサイト14によって形成されたコンデンサーの誘電特性の変化は、試料物質が結合した後、検出回路16によって検出される。例示のために、DNA塩基配列決定に用いられる、ハイブリダイズしたDNAを検出するための検出方法および装置の特定の態様について詳細に説明する。この応用においては、図2aおよびbに示されるように、装置は微細加工された基板上に計画的に配置された既知のオリゴヌクレオチドプローブ26への標的DNAの結合を検出する。結合のメカニズムは図4に示される。

【0028】（DNA/RNA塩基配列決定の情報処理）次に、標的DNA／プローブ結合のパターンの情報処理により、核酸塩基の1次配列決定を行う。

【0029】表1は、標的物質の1本鎖（16塩基）DNA分子との結合を検出するために用いられる8塩基合成オリゴヌクレオチドプローブのリストを例示する。アレイは可能なすべての8塩基プローブを含んでいてもよい。認識回路において8塩基の配列を重なり合わせるアルゴリズムが実行され、表2に示されるように、9個の検出された8塩基プローブは互いに関連づけられる。したがって、標的DNAは、得られた重なり合う16塩基の相補をとって、配列3'-ATCGCTTACGGTAATG-5'であると決定することができる。

【0030】

【表1】検出された8塩基合成オリゴヌクレオチドプローブ

（アルファベット順、5'→3'方向）

```
AATGCCAT
AGCGAATG
ATGCCATT
CGAATGCC
GAATGCCA
GCCATTAC
GCGAATGC
TAGCGAAT
TGCCATTA
```

【表2】

8塩基プロローブの重なり合う配列

5' -TAGCGAAT
 AGCGAATG
 GCGAATGC
 CGAATGCC
 GAATGCCA
 AATGCCAT
 ATGCCATT
 TGCCATTA
 GCCATTAG-3'

5' -TAGCGAATGCCATTAG-3'

(検出) アレイ12上のテストサイト14の中の標的DNAの存在の検出は、単純な二者択一の決定、すなわち標的DNA28が特定のDNAプロローブに結合するか否かである。標的DNAは実質的に合成プロローブ26より長い(例えば8塩基のプロローブに対して100塩基の標的DNA)。したがって、結合が生じた結果、DNA量の増加および溶液中の対イオンの再配列により、テストサイト14の物理的性質が変化する。

【0031】検出回路16は、対イオンの再配列によって生じたそれぞれのテストサイト14における局部的な電気的性質の変化を迅速に検出することができる。伝統的には、コンダクタンス σ (電界の影響の下で集団電荷キャリア(collective charge carrier)が移動する容易性)および誘電率 ϵ (局在する電荷分布が電界の影響の下で再配列しうる量)によって、直流からMHzの周波数の範囲において材料の電気的性質が特徴づけられる。誘電体等の、コンダクタンスの低い材料の場合には、主として誘電定数(=比誘電率) ϵ の測定によって、電気的性質を特徴づけることができる。誘電定数は試料の大きさには依存せず、したがって、材料特有の性質を示す。しかし、印加する交流電界の周波数を高くするにつれて、局部的な双極子電荷が再配列することがで

きなくなっていくために、誘電定数はしばしば周波数依存効果を示す(誘電分散)。結果として、材料の特定の分極は周波数 f_r において「緩和」し、そのために誘電定数が減少する。この緩和周波数は、緩和時間 $\tau = 1 / 2\pi f_r$ に関係し、ここで緩和時間とは、即時に印加された電界に対して e^{-1} の双極子が整列するために必要な時間である。誘電率は周波数依存性の複素数として表わされる(デバイ(P. Debye, Polar Molecules, The Chemical Catalog Co., New York, (1929))を参照のこと)。

【0032】

【数1】

$$\bar{\epsilon}(\omega) = \epsilon_{\infty} + (\Delta\epsilon / (1 + j\omega\tau))$$

式中、 ϵ_{∞} は、分極が生じない非常に高い周波数において測定された比誘電率であり、 $\Delta\epsilon = \epsilon_s - \epsilon_{\infty}$ であり、ここで ϵ_s は静電(DC)比誘電率である。もしくは、誘電率は実数および虚数の形式によって、次のように表わすこともできる。

【0033】

【数2】

$$\begin{aligned}\epsilon(\omega) &= \epsilon_{\infty} + (\Delta\epsilon(1 - j\omega\tau) / (1 + \omega^2\tau^2)) \\ &= (\epsilon_{\infty} + (\Delta\epsilon / (1 + \omega^2\tau^2))) - j(\Delta\epsilon\omega\tau / (1 + \omega^2\tau^2)) \\ &= \epsilon' - j\epsilon''\end{aligned}$$

ここで ϵ' はエネルギー保存(電界と試料の間の、損失のないエネルギー交換)を表わし、 ϵ'' はエネルギー損失(電界から失われ、通常は熱の形で材料に吸収されるエネルギー)を表わす。また、損失率:

$$D = \epsilon'' / \epsilon'$$

は、材料の比損失率または吸収特性を表わすと定義することができる。これらの所望の誘電特性の値を得るためには、いくつかの測定手法を用いることができる(フォンヒッペル(von Hippel, A.), 誘電および電波(Dielectrics and Waves, Wiley, New York (1954))を参照の

こと)。ほとんどの測定手法は、比較的大きな試験装置、すなわち平行板コンデンサーの構築を含む。被験材料は2つの電極板(電極面積A、電極間距離d)に挟持される。d $\ll\sqrt{A}$ のとき、材料中にフリッジ電界効果の低いほとんど均一な電界が生じ、次に、容量を測定することによって複素数の誘電率の実数部分が与えられる。

【0034】 $\epsilon'' = (Cd) / (A\epsilon_s)$

虚数部分は損失率Dを測定することによって得られる。

【0035】4末端平行板の試験装置を用いて、低濃度

水溶液中のDNAの電気的性質の値を得ることができ

る。4末端試験装置は誘電測定において典型的に用いられるものであり、自己誘導または相互誘導により導線間に生じる望ましくない誤差を最少限にすることができ、 ϵ' および ϵ'' によって表わされるDNA誘電分散のグラフはよく知られたものであり、タカシマの文献に詳細に記述されている (Takashima, S. J. Mol. Biol. 7:455-467 (1963))。分散は、DNA分子の骨格を形成する、負に荷電して溶液中の対イオンを引き付けるリン酸基から生じる。DNAは螺旋双極子モーメントを有しないが (単純な直鎖ポリリン酸であるため)、印加された電界の影響の下で、溶液中の対イオンがDNA骨格に沿って再配列し、大きな双極が誘導される。分散、したがって緩和周波数は、イオンの移動度、周囲のイオン性媒質の誘電率およびDNAの長さに依存し、次の式に従う。

$$[0036] f_r = (2\mu z q^2 / \pi \epsilon) / L^2$$

式中、LはDNAの有効分子長であり、qは電荷であり、 μ は対イオンの表面移動度であり、zは周囲のイオン性溶液中のイオンの数であり、 ϵ はzイオンの周囲イオン性溶液の有効誘電率である。

[0037] したがって、有効DNA塩基長さが、ハイブリダイズしていない状態 (10merのDNAプローブ) からハイブリダイズした状態 (100塩基の1本鎖標的DNA分子にハイブリダイズした10merのDNAプローブ) に変化すると、対応する緩和周波数の変化は10倍から100倍に変化する。したがって、誘電測定から得られた誘電緩和周波数を、ハイブリダイゼーションが生じたか否かを区別しうる検出に用いることができる。

[0038] それぞれのプローブの部位に比較的大きな平行板試験装置が必要とされるため、通常の緩和測定方法をハイブリダイゼーション検出に適用するには限界がある。測定値の記録と緩和周波数の抽出に比較的に長い時間 (秒) が必要であることも合わせ、DNA塩基配列決定に応用するためには、通常の大い平行板試験装置は実用的ではない。

[0039] 本発明に開示される微細加工された装置および検出手法は、大きなDNAプローブアレイのハイブリダイゼーションの迅速な検出を可能にする。図2aおよびbに示されるような、微細な大きさであることを特徴とする誘電試験装置は、標準的な写真平板エッチング手法を用いて、通常の微小電子基板に埋め込まれる。図2aにおいては、適当な微細電極が面積約100 μm^2 の試験装置の底部を形成する。合成オリゴヌクレオチドプローブ26を底部微細電極に連結させる。長いDNAリガンド28を表面に結合させて洗い流すと、相補的なDNAプローブ分子を含むチップ上の微細テストサイト14においてのみハイブリダイゼーションが生じる。このようにして得られた、結合したDNAを含むウェルは、異なる電気的性質を示すため、これを検出することができる。

[0040] 種々の周波数の信号をそれぞれのテストサイトに与えることにより、テストサイトの緩和周波数を検出することができる。得られた緩和周波数は、テストサイト中において結合が生じたか否かを示す。図5は、結合および非結合のテストサイトについて、周波数の関数として分散のグラフを例示する。テストサイトが結合か非結合かは、ある周波数範囲をスキャンして緩和周波数を決定するか、あるいは別々の周波数をテストサイトに与えてそれぞれの周波数における分散 (D) を比較することによって決定することができる。最低限、非結合のテストサイトの予測緩和周波数と結合のテストサイトの予測緩和周波数の2つの周波数を与える必要がある。

[0041] (ブローブ) アレイ12を形成する1つの方法は、テストアレイ12の中のテストサイト14に連結されたブローブを用いるものである。所望の標的物質のタイプによって、オリゴヌクレオチド、1本鎖または2本鎖のDNAまたはRNA、抗体、抗原抗体複合体、腫瘍細胞、あるいは当業者に周知のその他のテストブローブ等の種々のブローブをテストサイト14に連結させることができる。ブローブは、ウェル20の表面の固体支持基板に定着させるか、またはプレートに直接連結させることによって、テストサイトに連結させることができる。例えば、ブローブは図2aのプレート24aまたは図2bのプレート24aおよびbに直接連結させてもよい。ウェル20の表面において用いることのできる固体支持基板には、ガラス等の無機基板、ポリスチレン、二酸化シリコン、窒化シリコン等がある。固体基板は官能基化して、選択されたブローブと化学的に共有結合を形成することのできる表面を形成しなければならない。一例として、ガラス基板はエポキシシランと反応させることにより、エポキシド基で官能基化することができる。パークム (Parkam) およびラウドン (Loudon) の文献 (BBRC 1:1-6 (1978)) に記載されるように、支持基板上のエポキシド基は、5'アミノ誘導オリゴヌクレオチドブローブと反応して、2級アミン結合を形成する。この共有結合の形成によって、ブローブ26は所望のアレイの支持表面に連結される。官能基化されたポリスチレン表面の例は、クレムスキー (Kremsky) らの文献 (NucL. Acid. Res. 15:2891-2909 (1987)) に記載される、ヒドラジド活性化されたポリスチレンと結合した5'アルデヒドまたはカルボン酸誘導体、およびランド (Lund) らの文献 (NucL. Acid. Res. 16:10861-10880 (1988)) に記載される、ジアゾ化によって活性化されたポリスチレンと結合した5'アミノ誘導体、およびアミノ化されたポリスチレンに結合した5'リン酸誘導体である。

[0042] ブローブをプレート24aおよびbへの直接連結させるためには、プレート表面をブローブと複合体を形成することのできる材料で加工しなければならない。ブローブの表面に取り込まれてブローブと直接結合

しうる材料としては、金、酸化ニオブ、酸化イリジウム、白金、チタンその他の金属等の、電気金属材料がある。ホワイトサイド (Whitesides) らの文献 (Langmuir 6:87-96 (1990)) およびヒックマン (Hickman) らの文献 (J. Am. Chem. Soc. 113:1128-1132 (1991)) に記載されるように、これらの電気金属は、プレートに取り込まれた有機チオール基と結合させることにより安定な複合体をプレート表面に直接形成することができる。一例として、5'末端または3'末端においてチオール基で標識された合成DNAプローブは、プレート表面において金等の金属と安定な複合体を形成し、プローブが直接結合したアレイを作る。

【0043】下準備として、ガラスの固体支持体にエポキシドーアミンを取り込むことによって、官能基化された固体支持基板を調製し、次にオリゴヌクレオチドプローブを5'末端において1級アミンと結合させる ($\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_6$)。ガラスプレートは濃硝酸に浸漬し、水とエタノールで洗い流し、次に150°Cで数時間乾熱することによって洗浄する。このプレートをクロロホルムとアセトニトリルで洗い流し、デシケータ中で減圧下に保存する。次に表面をトルエン中の10%ジクロロジメチルシランで一晩処理することによって均一にシラン化し、メタノールで洗い流す。次に、表面に穴をあけてアレイのウェル (直径1mm、深さ0.25mm) を形成し、新鮮なシラン化されていないガラスを露出させる。ウェルは硝酸で洗浄し、次に水とエタノールで洗い流し、80°Cで一晩乾熱する。次に、ウェルのガラス表面をガンマグリシドオキシプロピルトリメトキシシラン (エポキシシラン) で誘導化する。研究した溶媒系のうち、10%のジソプロピルエチルアミンを含む90%エポキシシランによって、最も高い密度の活性化エポキシドが得られた。

【0044】アレイを形成するその他の方法は、基板上でプローブを加工するものであり、この方法は大きなアレイにはより適当である。プローブのオンチップ合成は、「非常に大きいスケールの固定化ペプチド合成」と題するPCT国際公開WO90/15070 (発明者ピーラング (Pirrung) ら、出願者アフィマックステクノロジーズ (Affymax Technologies)、国際公開日1990年12月13日) に記載されている。

【0045】(応用) DNAおよびRNAの検出に関する本発明の商業的応用としては、遺伝学的研究、遺伝的および感染による疾病の診断、毒性試験、個人同定、植物の同定および施肥の最適化、汚染検出による品質保証、および突然変異の検出による職業上の危険性のスクリーニングなどがある。

【0046】一般に、ヒトには4,000から5,000の遺伝的疾患があると試算されており、このような疾患においては、遺伝子の変異が遺伝子産物の機能を破壊するか妨害し、重症の医学的状態をもたらす。これまでのところ、ヒトの遺伝的疾患のわずか一部についてしか、影響を受

けた遺伝子および蛋白質 (遺伝子産物) が同定されていないが、その数は定常的に増加している。変異が疾病と関係するヒトの遺伝的疾患のいくつかの例が同定されており、これには嚢胞性繊維症、フェニルケトン尿症、アルツハイマー病、癌、デュシェンヌ型進行性筋ジストロフィーおよび家族性高コレステロール血症がある。場合によっては疾病は1つまたは数少ない特定の変異と関係しているが、多くの (ほとんどがそうだというわけではないが) 遺伝的疾患が、影響を受けた遺伝子に沿って分散する多数の変異のいずれかにより引き起こされていることが明らかになりつつある。前者の場合、欠損遺伝子の存在は、合成DNAプローブを用いて、野生型と変異型のDNA配列を識別する単純なDNAハイブリダイゼーション検査によって検出することができる。後者の場合には、全遺伝子にわたって疾病に関係する変異を探すために、実質的なDNA塩基配列決定を行わなくてはならない。

【0047】疾病と関連する遺伝子中に変異を検出することは、劣性の遺伝子疾患のキャリアをスクリーニングし、遺伝についてのカウンセリングと出産の決定について情報を与えることができる点、および、出生前の診断により治療を可能にする手段を与えることができる点との双方において重要である。オリゴヌクレオチドプローブを適当に選択することによって、塩基配列決定装置10は、標的遺伝子中の変異を迅速に検出し、特に多くの異なる変異がその欠損の原因となる場合に遺伝子疾患の診断とキャリアの同定を行うことのできる、遺伝子を標的とする新しいDNA塩基配列決定手法を提供する。さらに重要な点は、おそらく、標的遺伝子中のどの変異が実際に疾患に関係しており、どの変異が無害のポリモルフィズムを示すかを発見するための集団研究を可能にする、迅速でスループットが高いという性質である。この情報は破壊的な変異を特異的に検出するための技術を単純化することが期待され、また、有用な構造機能相関を明らかにすることによって、治療法の開発につながることを期待される。

【0048】本発明は、遺伝的疾患に限定されるものではない。すなわち、本発明は感染性因子の迅速かつスループットの高い同定に用いることができる。ウイルスまたは微生物のそれぞれの種または株は、アレイ12中において、独特の、診断に用いることのできるハイブリダイゼーションパターンを示す。

【0049】上述の、遺伝子を標的物質とする変異検出は、環境の研究においてもまた重要な用途を有する。例えば、細胞が慢性的に化学物質に暴露されることによって生じる変異を検出することができる。同様に、本発明は、職場で化学物質あるいは放射線に暴露される従業員の個人的モニタリング (循環白血球の中の変異の定期的なスクリーニング等によって) に用いることができる。

この技術の重要な応用は、特定の遺伝子の大規模および

10

20

30

40

50

点突然変異の特性を明らかにすることによる、変異原性のリスクを予測するモデル（例えばヒポキサンチン・グアニン フォスホリボシルトランスフェラーゼ（H P R T）等のための）の開発にある。

【0050】高密度アレイはゲノム塩基配列決定に多くの用途を有し、現在行われている、ヒトゲノムの3億塩基対のすべてを決定するというヒトゲノムプロジェクト（H G P）において重要な役割を果たすだろう。しかし、さらに重要なことは、迅速かつスループットの高い塩基配列決定技術が利用可能になることによって、新しいヒトゲノムプロジェクトが生まれることであろう。複雑な複数遺伝子疾患条件およびその他の遺伝的性質の特徴を明らかにするために、多数の個人に由来するヒトゲノムの重要な部分の反復DNA塩基配列決定を行うことが必要とされるであろう。このプロジェクトの活動は、現在のH G Pの終了後も長期間持続し、生物医科学に革命的な進歩をもたらすであろう。

【0051】本発明のその他の可能な用途は「DNAタイピング」、すなわち、個人間のDNA塩基配列の相違を分析することである。本発明の塩基配列決定装置は、ある個人のDNA中の多数のポリモルフィズムのマーカーを同時にスクリーニングすることができるため、制限*

ブロープのタイプ

標的物質

DNA、RNA

抗体

細胞

ホルモンリセプター

アビジン

イムノグロブリン

酵素

レクチン

ペプチドまたはその他の抗原をブロープとして用いると、図6に示すように、生物学的溶液中にある抗体を検出することができる。

【0055】この態様においては、ペプチド抗原（ブロープ26）は、例えば、一方の末端にシランを有し、もう一方の末端にエポキシドまたはその他のペプチド特異的な基を有するような、2官能性のクロスリンク用試薬を用いて、固体支持体に連結される。

【0056】次に、処理済みの表面を抗体（標的物質28）を含む溶液とともにインキュベートする。抗体は大きな分子であるため（クラスにより、分子量150,000から950,000）、生じた標的物質／ブロープ間相互作用は、誘電緩和プロセスを大きく変化させる。この効果の大きさは、さらに標的抗体に特異的な2次抗体で標的物質／ブロープ複合体を処理して、非常に大きい複合体を形成することにより増幅することができる。

【0057】抗体／抗原および抗体／抗体の相互作用の親和性および選択性はよく知られており、現存するバイ

* 酵素切断片長ポリモルフィズム（R F L P）分析という、時間と労力を要する現在の技術に比べて非常に多くの利点を有している。DNAタイピングは、法医学および実父血液テストにおいて重要な役割を果たしうる。さらに、すべての軍人のDNAタイピングに興味を持たれている。

【0052】有用な新しい植物および家畜が遺伝子工学の手法により開発されるのに伴い、農業生産物の起源と所有権を確定するためにDNAタイピングが必要とされるであろう。ヒト、植物および動物のゲノム配列決定から得られるDNA配列の情報は、医薬品の開発および改良された作物と家畜の創造において、遺伝子工学の手法の応用を増加させるであろう。これらの例としては、病気および厳しい気候に対してより耐性のある種、およびより多い収穫量または高い栄養価を有する作物がある。

【0053】本発明はDNAおよびRNA以外の分子構造の標的物質、例えば細胞や抗体の検出に用いることができる。表3には、標的物質として用いることのできるその他の分子構造に適したブロープのタイプを示すが、これらに限定されるものではない。

【0054】

【表3】

ブロープ

オリゴヌクレオチド

抗原（ペプチド）、抗-抗体

抗体、蛋白質

ホルモン

ビオチン

プロテインA

酵素因子

特異的炭水化物

オプテクトロジー（E L I S Aアッセイ、イムノヒストケミストリー、その他）の基本となっている。本明細書中で述べられている技術は、これらのよく理解されている結合相互作用を新しい微細電気的検出法において用いるものである。

【0058】この方法の商業的応用は、血液試料またはその他の細胞性溶液中に存在する数百から数千の異なる抗体その他の蛋白質を同時に検出するために用いることができるということである。このことは、血液タイピング、A I D S等のウイルス感染の検出、またはガンの診断において特に有用である。また、研究の手段としても極めて有用である。この方法は、抗体／抗原相互作用を検出するE L I S Aアッセイその他の生化学的手法の使用を置き換えるか拡大することができる。

【0059】ブロープとしてペプチド、抗体、または細胞に結合するその他の分子を用いると、図7に示すように、生物学的溶液中の特定の細胞のタイプを検出するためにこの検出器を用いることができる。

【0060】この態様においては、プローブ26は抗体、蛋白質、または細胞表面に結合することが知られているその他の分子からなる。この場合、標的物質28はプローブ26と結合しうるリセプター30を有するインタクトな細胞である。

【0061】細胞を含む溶液を検出器に加える。標的物質／プローブ結合相互作用に続いて、細胞は検出器のウェルに結合する。細胞は電流を通さず、低周波数の誘電緩和を示すため、細胞の結合はウェルの絶対コンダクションの変化（クールター（Coulter）原理の変法）また

は低周波数誘電緩和効果の誘導により検出することができる。【0062】この方法の商業的応用は、細胞表面の性質の変化した細胞、特に血液あるいはその他の体液中の細胞の存在を検出するために用いることができる点にある。固体組織由来の細胞は、標準的な方法によって組織を分散させた後に分析することができる。このような検出器はウイルス感染の診断および癌診断において有用であるばかりでなく、科学的研究の手段としても有用である。これは蛍光顕微鏡の使用（イムノヒストケミストリー）および蛍光活性化細胞選別に置き換わるであろう。

【0063】現在の微細加工技術により、均一な密度と性質を示す数メガビットのメモリーを安価に構築することができる。したがって、数百万の異なる生物学的テストウェルまたはテストサイトを含むことのできるアレイを、標準的な電子素子と同様のコストで小型化することができる。例えば、百万の生物学的テストサイトを含む1cm×1cmのアレイを容易に加工することができる。さらに、このようにして加工された装置は均一な電気的性質を有するため、多くのその他の方法よりも検出感度が向上する。

【0064】上述の微細加工された装置の1つの重要な利点は、この検出方法が標的物質／プローブ間分子結合を直接検出することにある。したがって、標的物質またはプローブに毒性のある蛍光または放射性マーカーを連結させる必要がない。検出のためには電気的分布の差異のみが必要である。このような電気的分布の差異は、多くの標的物質／プローブ結合（DNAおよびRNAのオリゴヌクレオチドへの結合等）において自然に生じる。しかし、結合に伴う差異が弱いかまたはない場合には、荷電した分子マーカーを標的物質に連結させることができる。特にDNAハイブリダイゼーション検出の態様においては、直接検出法は、アレイ中のそれぞれのテストサイトにおける標的物質／プローブ複合体の損失率の測定を含む。損失率は周波数によって異なる。すなわち、特性の大きさの変化が、微細加工アレイが腐食性の生物学的溶液にさらされるためにやがては不明確になるのに対し、検出は周波数特性の変化によって観察される。したがって、この装置は正確性に影響することなく何回も洗浄し、再使用することができる。この検出方法は、ブ

レート24aおよびbのある程度の腐食には抵抗するが、より長く使用するためにプレートを不動態層でコーティングしてもよい。

【0065】本発明のその他の利点は、テストサイトに信号を送り検出測定するために用いられる電子回路を、生物学的アレイを含むウェファー上に直接加工しうることである。スイッチマトリクス、信号処理回路、およびエネルギー源をすべて同じチップの中に含ませることができ、このことによってアレイ全体にわたる迅速な検出が可能となる。結果として、作動回路をウェファー上に含ませることにより、実験のコストを非常に低減することもできる。

【0066】本発明は従来技術に伴う最も重要な問題を排除する。第1に、放射性元素または変異原性の蛍光色素への暴露が排除される。このようにして、従業者がさらされる危険性の量が非常に低減する。第2に、放射性または蛍光標識を核酸配列中に取り込ませる必要がなくなる。したがって、本発明は必要とされる時間と材料の双方を低減することができる。標的物質となりうるものを含む試料溶液を単にアレイ中の既知のプローブに加え、結合させるだけでよい。これらの検出装置は最少限の訓練を受けた従業者でも使用することができるため、従業者の訓練時間を低減することができる。

【0067】第3に、感度限界を微細加工されたテストサイト14の大きさ（1μm²の大きさ）まで下げることができる。オートラジオグラフのフィルムおよび蛍光色素の電気泳動の移動度の感度限界は問題ではない。むしろ、テストサイト14に連結されたプローブ26の密度が感度を直接決定する。微細電子的方法は、短い（ハイブリダイズしていない）1本鎖DNAと長い（ハイブリダイズした）1本鎖DNAの間で10倍の差を与えることが示されており、これに対し、挿入色素を用いる光学的方法は3倍の差を与える。

【0068】第4に、オートラジオグラフのフィルムを用いなくてもよい。フィルムの感光に必要な時間が低減される。核酸断片を標識する必要がないため、試料の調製時間も非常に低減される。検出方法は迅速であり、測定は十分な分子結合が完了すればすぐに行うことができる。さらに、測定工程をマイクロプロセッサ制御によって自動化することにより、アレイ中のそれぞれのテストサイトに非常に早くアクセスすることができる。

【0069】第5に、これらのタイプの検出装置において用いられる微細電子技術は、このような実験の価格を劇的に低減させるであろう。本発明は、メガビットのメモリーチップおよびメガピクセルのCCDイメージングチップを製作するのに用いられる効果的な大量生産技術を適用しうることを特徴とする。放射性標識手法に必要なハードウェア（βスキャナー）または、蛍光を基礎にした手法に必要なハードウェア（レーザー、DDCカメ

19

20

ラ、PMT、光学装置等)を必要としない。

【0070】本発明およびその利点を詳細に述べてきたが、特許請求の範囲に記載される本発明の目的および範囲から逸脱することなく、様々な変更、置換、転用が可能であることが理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、検出および配列決定の装置の図解を示す。

【図2】図2は、図1のアレイにおいて用いるためのテストウエルの例を示す。

【図3】図3は、テストサイト中における標的物質のプロープへの結合を示す。

【図4】図4は、合成DNAプロープの標的DNA配列への結合を示す。

【図5】図5は、結合および非結合のテストサイトについての代表的な、周波数の関数としての分散のグラフを示す。

*【図6】図6は、試料中の抗体を検出するためのテストウエルを示す。

【図7】図7は、試料中の特定の細胞のタイプを検出するためのテストサイトを示す。

【符号の説明】

10 塩基配列決定装置

12 アレイ

14 テストサイト

15 リング

16 検出回路

18 認識回路

20 ウエル

22 絶縁層

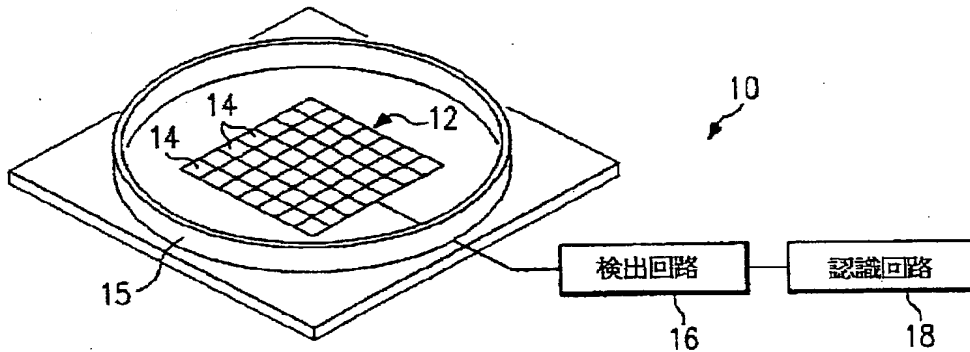
24 プレート

26 プロープ

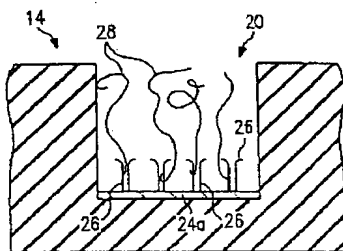
28 標的物質

* 30 リセプター

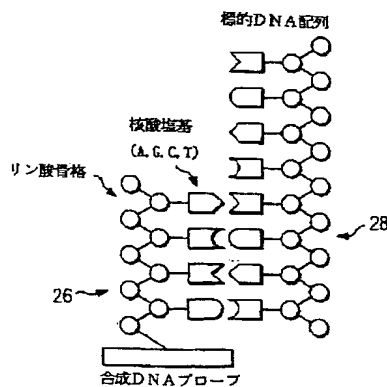
【図1】



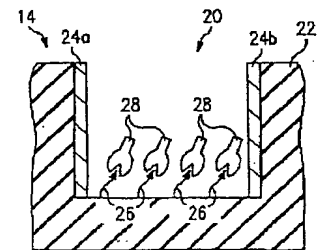
【図3】



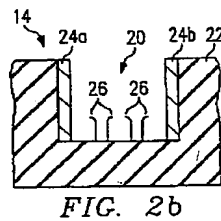
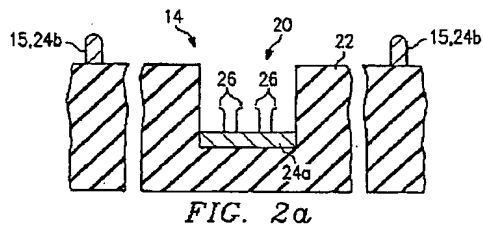
【図4】



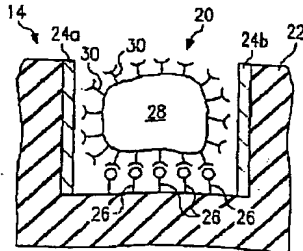
【図6】



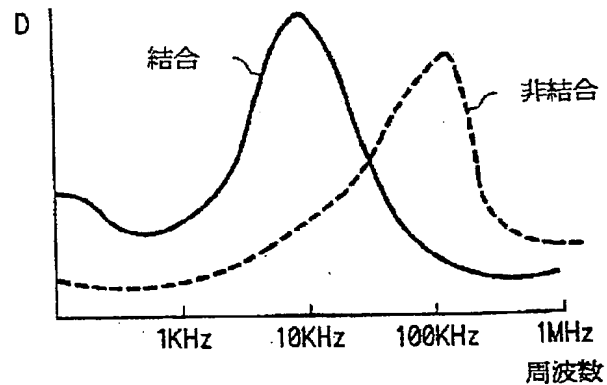
【図2】



【図7】



【図5】



フロントページの続き

(71)出願人 391058060
 ベイラー カレッジ オブ メディシン
 BAYLOR COLLEGE OF M
 EDICINE
 アメリカ合衆国、テキサス 77030、ヒュ
 ーストン、ワン ベイラー プラザ (番
 地なし)

(71)出願人 591013573
 マサチューセッツ・インスティテュート・
 オブ・テクノロジー
 MASSACHUSETTS INSTI
 TUTE OF TECHNOLOGY
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139、
 ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベ
 ニュー 77

(72)発明者 ミッチェル・ディー・エガース
 アメリカ合衆国テキサス州77381、ザ・ウ
 ッドランズ、ブラム・コート 10

(72)発明者 マイケル・イー・ホーガン
アメリカ合衆国テキサス州77381, ザ・ウ
ッドランズ, ゴールデン・シャドウ・サー
クル 103

(72)発明者 ケネス・ローレン・ビーティ
アメリカ合衆国テキサス州77381, ザ・ウ
ッドランズ, ホリーミード・ドライブ 2

(72)発明者 ジョン・シュメーカー
アメリカ合衆国テキサス州77005, ヒュー
ストン, ロクストン・ロード 2250

(72)発明者 ダニエル・ジェイ・エーリック
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02173,
レキシントン, グラント・ブレース 11

(72)発明者 マーク・ホリス
アメリカ合衆国マサチューセッツ州01742,
コンコルド, スタッフォードシャー・レー
ン 45

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED TEXT OR DRAWING~~
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ ~~LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT~~
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.